

# Полиморфизм комаров-переносчиков малярии в Средней Азии по данным анализа ДНК ITS2 района

О. Е. Лопатин <sup>1</sup>, А.В. Катохин <sup>2</sup>, И.Т. Абдуллаев <sup>3</sup>, Е. Маргалит <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Институт зоологии РК, Алматы, Казахстан, <sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, <sup>3</sup> Институт медицинской паразитологии, Самарканд, Узбекистан, <sup>4</sup> Университет Бен Гурион, Беэр Шева, Израиль

## Введение

В последние десять лет достижения молекулярной генетики оказали значительное влияние на развитие популяционной биологии и генетики. В частности, они позволили разработать эффективные методы генотипирования и установления филогенетических отношений между организмами с помощью анализа структуры популяционно-генетических молекулярных маркеров. Было разработано несколько типов таких молекулярно-генетических маркеров:

### 1. Митохондриальные (mitochondrial):

- полиморфизм по длине рестрикционных фрагментов ДНК (RFLP);
- полиморфизм в нуклеотидной последовательности (Sequence polymorphism);

### 2. Ядерные многолокусные (multilocus nuclear):

- “Отпечатки” микро/мини-сателлитов (micro/mini-satellite “fingerprints”)
- таксонпринт (RFLP/Taxonprint);
- Случайно амплифицированные полиморфные фрагменты ДНК (RAPD);
- Полиморфизм по длине амплифицированных фрагментов ДНК (AFLP);
- Полиморфизм секвенс-специфических амплифицированных фрагментов ДНК (SSAP);

### 3. Ядерные однолокусные (single-locus/single-copy nuclear):

- Аллоферменты (allozymes);
- Мини-сателлиты (mini-satellites);
- Микро-сателлиты (micro-satellites);
- Полиморфизм по длине рестрикционных фрагментов ДНК (RFLP);
- Полиморфизм по структуре кластера рибосомальной ДНК (rDNA/SSAP);
- Полиморфизм по последовательности определенных генов (specific gene sequence polymorphism, Sunnucks, 2000).

Различные методы генотипирования были успешно применены для исследования межвидовых и внутривидовых отношений в роде *Anopheles* (Таб. 1). Особенно подробно и разными методами был исследован африканский комплекс видов *gambiae*. Применение молекулярных маркеров позволило подтвердить и уточнить вывод, основанный на данных цитогенетического анализа, что этот комплекс состоит из видов-близнецов, т.е. почти не различимых морфологически видов, часто обитающих симпатрически, но тем не менее обладающих различными важными экологическими характеристиками, такими как разные предпочтения прокормителей, места дневок и откладки яиц, разная способность к переносу возбудителей болезней и к развитию устойчивости к инсектицидам и т.д. (Powell *et al.*, 1999). Таким образом была продемонстрирована необходимость тонкого генотипирования видов *Anopheles* и выявления скрытых комплексов видов. Было высказано даже мнение, что более половины всех переносчиков малярии или представлены известными комплексами, или подозреваются как таковые (Collins, Paskewitz, 1996).

**Таблица 1.** Примеры исследований филогенетических отношений между видами в роде *Anopheles* с применением ядерных молекулярных маркеров.

| ЯДЕРНЫЕ МНОГОЛОКУСНЫЕ (multilocus nuclear)               |   |  |
|--|---|--|
| RFLP/Taxonprint  | <i>An. messeae</i>  | Novikov,<br>2001<br>Shevchenko,  |
| RAPD   | <i>An. gambiae</i> , <i>An. arabiensis</i><br><i>An. gambiae</i> , <i>An. arabiensis</i><br><i>An. trinkae</i> , <i>An. dunhami</i>   | Favia <i>et al.</i> , 1994<br>Dimopoulos <i>et al.</i> , 1996<br>Lounibos <i>et al.</i> , 1998   |
| ЯДЕРНЫЕ ОДНОЛОКУСНЫЕ (single-locus/single-copy nuclear ) |   |  |
| Allozymes  | <i>An. gambiae</i> complex<br><i>An. gambiae</i><br><i>An. trinkae</i> , <i>An. dunhami</i>   | Besansky <i>et al.</i> , 1994<br>Lehmann <i>et al.</i> , 1996<br>Lounibos <i>et al.</i> , 1998   |
| Micro-satellite  | <i>An. gambiae</i><br><i>An. gambiae</i> , <i>An. arabiensis</i>  | Lehmann <i>et al.</i> , 1996,1997<br>Kamau <i>et al.</i> , 1998, 1999  |
| RFLP   | <i>An. gambiae</i> complex<br><i>An. dirus</i> complex  | Collins <i>et al.</i> , 1988<br>Panyim <i>et al.</i> , 1988  |
| rDNA/SSAP  | <i>An. freeborni</i> , <i>An. hermsi</i><br><i>An. gambiae</i> complex<br><i>An. gambiae</i> complex<br><i>An. trinkae</i> , <i>An. dunhami</i><br><i>An. punctulatus</i> complex<br><i>An. quadrimaculatus</i> complex<br><i>An. darlingi</i><br><i>An. maculipennis</i> complex | Porter,Collins, 1991<br>Paskewitz <i>et al.</i> , 1993,<br>Besansky <i>et al.</i> , 1994<br>Mukabayire <i>et al.</i> , 2001<br>Lounibos <i>et al.</i> , 1998<br>Beebe, Saul,1995, Beebe <i>et al.</i> , 1999<br>Cornel <i>et al.</i> , 1996<br>Malafronte <i>et al.</i> , 1999<br>Proft <i>et al.</i> , 1999, Marinucci <i>et al.</i> , 1999 |
| Specific gene sequence                                   | <i>An. gambiae</i> complex<br><i>An. gambiae</i> complex  | Besansky <i>et al.</i> , 1994<br>Mukabayire <i>et al.</i> , 2001   |

По мере развития методов генотипирования были сформулированы определенные требования к популяционно-генетическим молекулярным маркерам. Степень их эффективности зависит от следующих характеристик:

Однолокусность (Single locus)

Кодоминантность (Codominant)

Возможность аллельной генеалогии (Allele genealogy feasible)

Возможность быстрого перехода на другие таксоны (Rapid transfer to new taxa)

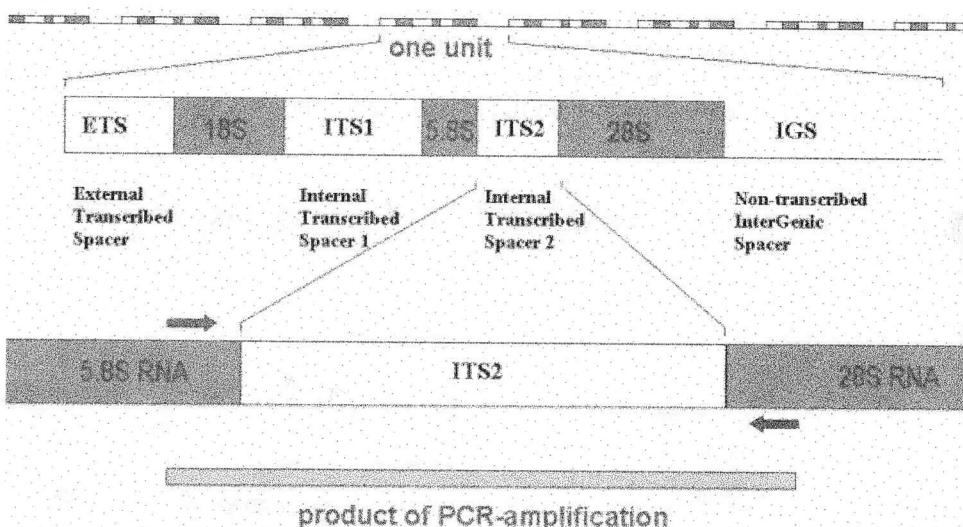
Соответствие общей изменчивости таксономическому диапазону (Overall variability fit to taxonomic range)

Сопоставимость с другими работами (Connectibility of data among studies).

Из технических соображений желательно, чтобы анализ молекулярных маркеров проводился основанными на ПЦР методиками с минимальными требованиями к навыкам персонала, затратами времени и средств (Sunnucks, 2000).

Комплексное использование метода амплификации определенных участков ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), применение для ПЦР эволюционно консервативных наборов праймеров, усовершенствование методов секвенирования, а также разработка мощных и доступных компьютерных методов анализа нуклеотидных последовательностей позволило выявить и использовать для анализа богатую, но ранее недоступную молекулярно-генетическую информацию об организмах. В частности, это относится к ряду переносчиков малярии из рода *Anopheles*.

Одним из наиболее популярных методов с применением молекулярных маркеров является анализ изменчивости во втором внутреннем транскрибуируемом спэйсере (ITS2), расположенному в кластере rDNA между генами рибосомных РНК 5.8S и 28S. Кластер rDNA состоит более чем из 100 копий tandemно расположенных транскрипционных единиц, отделенных друг от друга межгененным нетранскрибуируемым промежутком (IGS). Первичная транскрипционная единица включает районы, которые после процессинга дают три основных рибосомальных РНК – 18S, 5.8S и 28S, а также районы, удалаемые процессингом – внешний транскрибуируемый промежуток (ETS) и два внутренних транскрибуемых промежутка (ITS1 и ITS2) (Collins, Paskewitz, 1996). На рис. 1 показана структура этого транскрипционного района.



**Рис. 1.** Структура кластера генов рибосомных РНК (rDNA).

Анализ полиморфизма по длине и структуре ITS2 был успешно применен для генотипирования криптических, т.е. морфологически трудно различимых видов в роде *Anopheles*. Например, при исследовании вида *An. maculipennis* удалось показать, что этот вид представлен комплексом видов-близнецовых, различающихся по таким важным экологическим свойствам, как предпочтение разных прокормителей, экзо- или эндофильность и т.д. Это открытие позволило объяснить феномен «анофелизм без малярии» в Европе (Collins and Paskewitz, 1996, Besansky, 1999).

Таким образом, более точное определение ранее неизученных, возможных криптических видов *Anopheles*-переносчиков малярии в Средней Азии и Казахстане для их более детальной экотопической дифференциации на основе применения метода генотипирования по ITS2-маркеру, представляется весьма актуальной задачей.

## Материалы и методы

Для анализа были взяты:

*An. hyrcanus* (Узбекистан), *An. pulcherrimus* (Узбекистан), *An. superpictus* (Узбекистан), *An. maculipennis* s.s. (Узбекистан), *An. martinii* (Узбекистан), *An. messeae* (Казахстан, Западная Сибирь), *An. beklemishevi* (Западная Сибирь)

Виды *An. maculipennis* s.s., *An. martinus*, *An. messeae*, *An. beklemishevi* принадлежат палеарктическому комплексу видов-двойников *maculipennis*, для которого были оценены филогенетические связи и разработано дифференциальное генотипирование видов этого комплекса (Proft *et al.*, 1999, Marinucci *et al.*, 1999).

Имаго и личинки комаров *Anopheles*, обитающих в Средней Азии, были собраны во время полевых сборов в 2000-2002 годах. Видовая принадлежность образцов была морфологически определена в Институте медицинской паразитологии (Узбекистан) и д.б.н. Омаркули Маметниязовым (Институт зоологии и паразитологии, Туркменистан). В работе также были использованы образцы *Anopheles* из казахстанских популяций.

Образцы ДНК из личинок и взрослых комаров готовились по методике Бендера с соавторами (Bender *et al.*, 1983). Условия реакции соответствовали рекомендациям Профт с соавторами (Proft *et al.*, 1999) с незначительными модификациями, набор праймеров для амплификации ITS2 маркера с помощью ПЦР соответствовал набору, предложенному авторами этой работы.

### Результаты и обсуждение

Был проанализирован полиморфизм по длине ПЦР-продукта, получаемого с применением пары эволюционно-консервативных праймеров, специфических к районам в генах рибосомных РНК 5.8S и 28S, flankирующих ITS2. Наиболее типичные электрофоретические спектры ПЦР-продуктов ITS2, полученных с применением 5.8S-UN и 28S-UN праймеров (Proft *et al.*, 1999), для проанализированных видов *Anopheles* представлены на рис. 2.

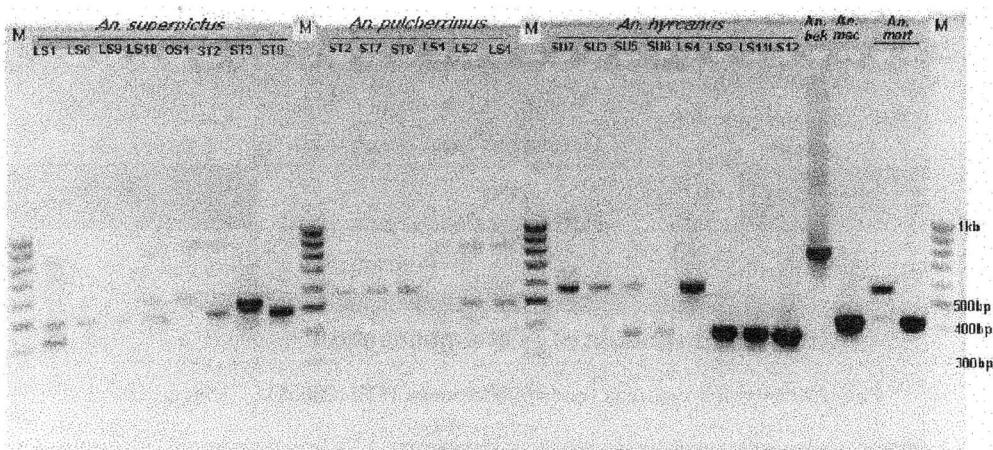


Рис. 2. Электрофоретические спектры ПЦР-продуктов ITS2 для некоторых образцов видов *An. superpictus*, *An. pulcherrimus*, *An. hyrcanus*, *An. beklemishevi*, *An. maculipennis* s.s., *An. martinus*.

Результаты определения размера ПЦР-продуктов ITS2, полученных с применением 5.8S-UN и 28S-UN праймеров (Proft *et al.*, 1999), для перечисленных видов представлены в табл. 2. На основании этих результатов можно заключить, что виды *An. martinus*, *An. hyrcanus* и *An. pulcherrimus* или полиморфны по этому маркеру (т.е. процесс гомогенизации rDNA-клスター не завершился), или недостаточно точно определены морфологически (т.е. могут являться комплексом еще не различных видов). В любом случае требуются дополнительные исследования структуры района ITS2, в частности, на нуклеотидном уровне.

**Таблица 2.** Размер ПЦР-продуктов ITS2, выявленных у образцов перечисленных видов, собранных в разных популяциях.

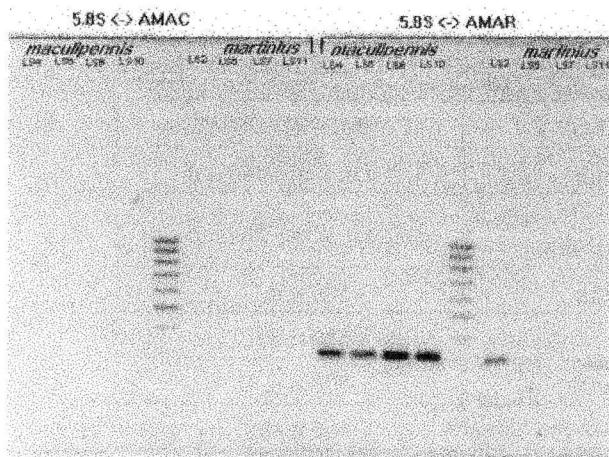
| ВИД                          | МЕСТО СБОРА                           | РАЗМЕР ПРОДУКТА         |
|------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| <i>An. hyrcanus</i>          | г. Самарканд                          | ~380 н.п. или ~580 н.п. |
| <i>An. hyrcanus</i>          | г. Узун, Сурхан-Дарьинская обл.       | ~380 н.п. или ~580 н.п. |
| <i>An. pulcherrimus</i>      | г. Самарканд                          | ~500 н.п.               |
| <i>An. pulcherrimus</i>      | г. Термез                             | ~580 н.п.               |
| <i>An.superpictus</i>        | г. Самарканд                          | ~500 н.п.               |
| <i>An.superpictus</i>        | г. Термез                             | ~500 н.п.               |
| <i>An. maculipennis s.s.</i> | г. Самарканд                          | ~420 н.п.               |
| <i>An. martinicus</i>        | г. Самарканд                          | ~420 н.п. ~590 н.п.     |
| <i>An. messeae</i>           | г. Алматы                             | ~450 н.п.               |
| <i>An. messeae</i>           | р. Шаган, Восточно-Казахстанская обл. | ~450 н.п.               |
| <i>An. beklemishevi</i>      | Горный Алтай                          | ~750 н.п.               |

Специальное исследование было предпринято, чтобы разрешить вопрос о том, комары какого из видов комплекса *maculipennis* обитают в окрестностях Самарканда. Сначала ПЦР-продукт ITS2 размером ~420 н.п., полученный для образца, определенного как *An. maculipennis s.s.*, был вырезан из агарозного геля, соответствующим образом очищен и просеквенирован. Нуклеотидная последовательность этого продукта оказалась на 100% схожа с последовательностью AJ224329 (Marinucci et al., 1999). Затем на основании этих последовательностей был найден район, по которому ITS2 *An. martinicus* отличается от ITS2 других видов, и был разработан видоспецифический праймер. Наконец, *An. maculipennis s.s.* и *An. martinicus* из Самаркандинских популяций (по четыре образца каждого вида, определенные по морфологическим признакам) были проанализированы с помощью *maculipennis*-специфического (AMAC, описанного Профт с соавторами (Proft et al., 1999) и *martinicus*-специфического (AMAR) праймеров. Результаты этого анализа представлены на рис. 3.

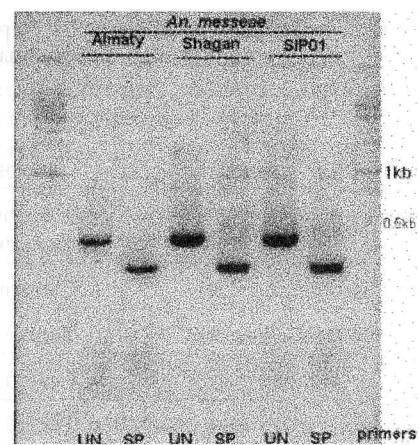
По данным этого анализа можно заключить, что, по крайней мере, четыре изученных образца, определенных как *An. maculipennis s.s.*, являются *An. martinicus*. Это указывает на необходимость тщательного молекулярного и морфологического анализа всех образцов, определенных как *An. maculipennis s.s.*.

Видовое разнообразие *Anopheles* на территории Казахстана представляет особый интерес, поскольку вопрос о присутствии в Южном Казахстане и в приаральском регионе нескольких видов-двойников комплекса *maculipennis* до сих пор не разрешен. Нами были проанализированы также электрофоретические спектры ПЦР-продуктов ITS2 у образцов, собранных в трех казахстанских популяциях определенных как *An. messeae*. На рис. 4 для этих образцов показана электрофорограмма ПЦР-продуктов ITS2, полученных с помощью консервативных (UN) и *messeae*-специфичного (SP) праймеров (Proft et al., 1999).

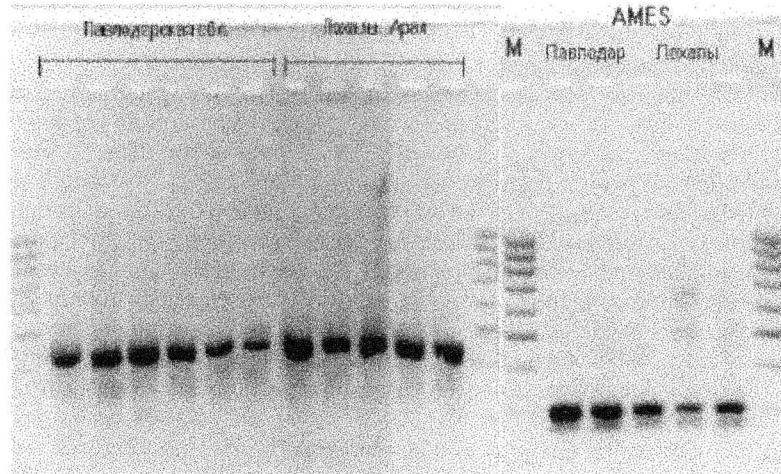
Эти результаты демонстрируют, что во всех трех популяциях (г. Алматы, р. Шаган и район около города Семипалатинск) видовая принадлежность образцов однозначно соответствует морфологическому определению. После этого мы проанализировали образцы, собранные в Приаралье. На рис. 5 представлены электрофорограммы ПЦР-продуктов ITS2 образцов из п. Лохалы (Приаралье) вместе с ПЦР-продуктами образцов имаго комаров из Павлодарской области.



**Рис. 3.** Электрофоретические спектры видоспецифических ПЦР-продуктов ITS2 для образцов *An. maculipennis* s.s. и *An. martinii*. Слева - реакция с применением 5.8S-UN и AMAC (*maculipennis*-специфического) праймеров. Справа - с применением 5.8S-UN и AMAR (*martinius* - специфического) праймеров.



**Рис. 4.** Электрофоретические спектры ПЦР-продуктов ITS2 для образцов *An. messeae* из трех казахстанских популяций. Реакции с применением только консервативных праймеров обозначены снизу UN. Реакции с применением 5.8S-UN и *messeae* - специфичного праймера (AMES) обозначены снизу SP.



**Рис. 5.** Электрофореграммы ПЦР-продуктов ITS2 для образцов, собранных в п. Лохалы (Приаралье) и в Павлодарской области. Слева - реакции с применением только консервативных праймеров, справа - с применением 5.8S-UN праймера и *messeae* - специфичного праймера (AMES)

В реакциях применяли как консервативные UN-праймеры, так и *messeae*-специфичный праймер AMES (Proft *et al.*, 1999). На основании полученных результатов можно заключить, что все проанализированные образцы принадлежат виду *An. messeae*. В сборе из п. Лохалы (Приаралье) другие виды-двойники из комплекса *maculipennis* пока не обнаружены.

Результаты анализа полиморфизма по линии ПЦР-продуктов ITS2 у видов рода *Anopheles*, обитающих на территории Узбекистана и Казахстана, демонстрируют, насколько актуальна задача тщательного генотипирования образцов

*Anopheles* для более адекватного планирования мероприятий по ограничению численности комаров-переносчиков малярии в этих регионах. Необходимы дальнейшие исследования для уточнения статуса изучаемых видов на обследованных территориях.

**Благодарности.** Представленные исследования проводились в сотрудничестве с Институтом медицинской паразитологии (Самарканд, Узбекистан), Институтом цитологии и генетики (Новосибирск, Россия), Германской противокомариной ассоциацией (Валдзее, Германия) и при поддержке Проекта ICA2-CT-2000-10045 Европейского Сообщества. Особая благодарность проф. Норберту Беккеру и доктору Паулю Шадлеру, доктору Омаркули Маметназову (Институт зоологии и паразитологии, Туркменистан), проф. Шавкату Разакову, доктору Игорю Пономареву и г. Берту Шнайдеру, доктору Александру Шевченко, доктору Наталье Лебедевой, гг. Галие Шамгуновой и Наталье Березиной, помогавшим нам в течение нескольких лет исследований.

### Литература

- Beebe N.W., Saul A., 1995.** Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction—restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 53(5): 478-481.
- Beebe N.W., Ellis J.T., Cooper R.D., Saul A., 1999.** DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. *Insect Mol. Biol.*, 8(3): 381-390.
- Bender W., Spierer P., Hogness DS., 1983.** Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the Ace and rosy loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, 168(1): 17-33.
- Besansky N.J., Powell J.R., Caccone A., Hamm D.M., Scott J.A., Collins F.H., 1994.** Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91(15): 6885-6888.
- Besansky N.J., 1999.** Complexities in the analysis of cryptic taxa within the genus *Anopheles*. *Parasitologia*, 41(1-3): 97-100. Review.
- Collins F.H., Petrarca V., Mpofu S., Brandling-Bennett A.D., Were J.B., Rasmussen M.O., Finnerty V., 1988.** Comparison of DNA probe and cytogenetic methods for identifying field collected *Anopheles gambiae* complex mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 39(6): 545-550.
- Collins F.H. and Paskewitz S.M., 1996.** A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol. Biol.*, 5(1): 1-9.
- Cornel A.J., Porter C.H., Collins F.H., 1996.** Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *J. Med. Entomol.*, 33(1): 109-116.
- Dimopoulos G., Zheng L., Kumar V., della Torre A., Kafatos F.C., Louis C., 1996** Integrated genetic map of *Anopheles gambiae*: use of RAPD polymorphisms for genetic, cytogenetic and STS landmarks. *Genetics*, 143(2): 953-960.
- Favia G., Dimopoulos G., della Torre A., Toure YT, Coluzzi M., Louis C., 1994.** Polymorphisms detected by random PCR distinguish between different chromosomal forms of *Anopheles gambiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91(22): 10315-10319.
- Kamau L., Hawley W.A., Lehmann T., Orago A.S., Cornel A., Ke Z., Collins F.H., 1998.** Use of short tandem repeats for the analysis of genetic variability in sympatric populations of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Heredity*, 80: 675-682.
- Kamau L., Mukabana W.R., Hawley W.A., Lehmann T., Irungu L.W., Orago A.A., Collins F.H., 1999.** Analysis of genetic variability in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* using microsatellite loci. *Insect Mol. Biol.*, 8(2): 287-297.
- Lehmann T., Hawley W.A., Kamau L., Fontenille D., Simard F., Collins F.H., 1996.** Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and west Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity*, 77: 192-200.
- Lehmann T., Besansky N.J., Hawley W.A., Fahey T.G., Kamau L., Collins F.H., 1997.** Microgeographic structure of *Anopheles gambiae* in western Kenya based on mtDNA and microsatellite loci. *Mol. Ecol.*, 6(3): 243-253.
- Lounibos L.P., Wilkerson R.C., Conn J.E., Hribar L.J., Fritz G.N., Danoff-Burg J.A., 1998.** Morphological, molecular, and chromosomal discrimination of cryptic *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) from South America. *J. Med. Entomol.*, 35(5): 830-838.

- Malafronte R.S., Marrelli M.T., Marinotti O., 1999.** Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 36(5): 631-634.
- Marinucci M., Romi R., Mancini P., Di Luca M., Severini C., 1999.** Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the maculipennis complex inferred from ITS2 sequence analysis. *Insect Mol. Biol.*, 8(4): 469-480.
- Mukabayire O., Caridi J., Wang X., Toure Y.T., Coluzzi M., Besansky N.J., 2001.** Patterns of DNA sequence variation in chromosomally recognized taxa of *Anopheles gambiae*: evidence from rDNA and single-copy loci. *Insect Mol. Biol.*, 10(1): 33-46.
- Novikov Iu.M., Shevchenko A.I., 2001.** Inversion polymorphism and the divergence of two cryptic forms of *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae) at the level of genomic DNA repeats. *Genetika*, 37(7): 915-925. (in Russian).
- Panyim S., Yasothornsrikul S., Tungpradubkul S., Baimai V., Rosenberg R., Andre R.G., Green C.A., 1988.** Identification of isomorphic malaria vectors using a DNA probe. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 38(1): 47-49.
- Paskewitz S.M., Ng K., Coetzee M., Hunt R.H., 1993.** Evaluation of the polymerase chain reaction method for identifying members of the *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) complex in southern Africa. *J. Med. Entomol.*, 30(5): 953-957.
- Porter C.H., Collins F.H., 1991.** Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 45(2): 271-279.
- Powell J.R., Petrarca V., della Torre A., Caccone A., Coluzzi M., 1999.** Population structure, speciation, and introgression in the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia*, 41(1-3): 101-113.
- Proft J., Maier W.A., Kampen H., 1999.** Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitol. Res.*, 85(10): 837-843.
- Sunnucks P., 2000.** Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.*, 15(5): 199-203.

### Summary

**Lopatin O., Katokhin A., Abdullaev I., Margalith Y.** Analyses of polymorphism ITS2 PCR-products of malaria-vector species from Uzbekistan and Kazakhstan.

The polymorphism lengthwise of PCR-product received with application of a pair of evolutional -conservative primers, specific to regions in genes ribosomal RNA 5.8S and 28S, outflanking ITS2 was analyzed. On the basis of these outcomes it is possible to conclude, that the species *An. martinii*, *An. hyrcanus* and *An. pulcherrimus* are either polymorphic on this token or they are not precisely determined morphologically and can be a complex not yet classified species. We parsed also electrophoretic spectra of PCR-product of ITS2 for specimens been collected at five Kazakhstan populations: neighborhood of Almaty city, Lokhaly town (Aral Sea region), Shagan River (East-Kazakhstan region), neighborhood of Pavlodar city and near Semipalatinsk city and defined as *An. messeae*. In reactions both conservative UN-primers and messeae-specific primer AMES were applied (Proft et al., 1999). On the base of the obtained data it is possible to conclude, that all parsed samples to *An. messeae* species are belonged.

For specimen as *An. maculipennis* s.s. defined the nucleotide sequence of a PCR-product of ITS2 by the size ~420 n.p. was determined. The sequence was turned out on 100% similar to sequence AJ224329 (Marinucci et al., 1999). On the base of these sequences the species-specific primer (AMAR) was designed. Defined by morphological characters as *An. maculipennis* s.s. and *An. martinii* mosquitoes were parsed with the help maculipennis-specific (AMAC Proft et al., 1999) and martinii-specific (AMAR) primers. By results of this analysis it is possible to conclude, that, at least, four studied samples, definite as *An. maculipennis* s.s., are *An. martinii*. Such concluding indicates necessity of the careful molecular and morphological analysis all samples as *An. maculipennis* s.s. definite.

Polymorphism lengthwise of PCR-product of ITS2 analyses for *Anopheles* species living at Uzbekistan and Kazakhstan demonstrate how the problem of careful genotyping *Anopheles* is actual for the best adequate planning of measures of malaria carriers - mosquitoes control in these regions. Further researches are needed to definite more precisely status of species under investigation at the inspected territories.